Aus der Medizinischen Klinik I des Bürgerhospitals Stuttgart
Chefarzt: Professor Dr. med. H. Ott
und dem Hygiene-Institut der Universität Tübingen
Direktor: Professor Dr. med. E. Bader

Untersuchungen zum Nachweis von Antikörpern im Serum geimpfter Personen, die gegen Tollwutvirus gerichtet sind

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin
einer Hohen Medizinischen Fakultät
der Eberhard-Karls-Universität
zu Tübingen

vorgelegt von
ANDREAS SZIEGOLEIT
aus Insterburg

1969

Aus der Medizinischen Klinik I des Bürgerhospitals Stuttgart
Chefarzt: Professor Dr. med. H. Ott

und dem Hygiene-Institut der Universität Tübingen
Direktor: Professer Dr.med. E.Bader

Untersuchungen zum Nachweis von Antikörpern im Serum schutzgeimpfter Personen, die gegen Tollwutvirus gerichtet sind.

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin
einer Hohen Medizinischen Fakultät
der Eberhard-Karls-Universität
zu Tübingen

vorgelegt von:

Andreas Sziegoleit
aus Insterburg

Dekan: Professor Dr. med. J. Hirschmann

1. Berichterstatter: Professor Dr. med. H. Ott

2. Berichterstatter: Priv.- Doz. Dr. med. H.-J. Gerth
(Prof. Dr. R.E.Bader)

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Herrn Prof. Dr. med. H. Ott, Chefarzt der Medizinischen Klinik I des Bürgerhospitals Stuttgart, möchte ich für die Überlassung des Themas und für die freundliche Unterstützung bei der Anfertigung der Arbeit danken.

Zu besonderem Dank verpflichtet bin ich dem Direktor des Hygiene-Institutes der Universität Tübingen, Herrn Prof. Dr. med. E. Bader, in dessen Institut die wesentlichen Versuche erst durchgeführt werden konnten. Während dieser Zeit betreute mich sein Oberassistent, Herr Priv.Doz. Dr. med. H. J. Gerth. Für diese Hilfe sei vielmals gedankt.

Danken möchte ich weiterhin Herrn Prof. Dr. med. vet. M. Mussgay, Präsident der Bundesforschungsanstalt für Viruskrankheiten der Tiere, Tübingen, für die Möglichkeit, die fluorescenzserologische Tollwutdiagnostik zu erlernen und seinem Mitarbeiter Herrn Dr. med. vet. L. G. Schneider für praktische Anleitung, zahlreiche Hinweise, die Überlassung des Flury-Rabiesvirusstammes, von konjugiertem Antirabiesimmunserum sowie von BHK-Zellen. In diesem Zusammenhang möchte ich auch Herrn Dr. Schwöbel für die Ratschläge bezüglich der Zellzüchtung danken. Ebenso gilt mein Dank Herrn Dr. Schepky vom Tierärztlichen Landesuntersuchungsamt Stuttgart, der mich in der ersten Phase der Arbeit mit tollwutinfizierten Mäusegehirnen versorgte.

Gliederung

Seite

Einleitung 1

Material und Methoden 6

- Untersuchungen der indirekten Immunfluoreszenz 7
- Verbesserung der Antigenpräparation 10
- Indirekte Immunfluoreszenz mit verbesserten Antigenen 14
- Komplementbindungsreaktion und Serumneutralisationstest 15
- Untersuchungen zur Interferenz von Rabiesviren 17
- Virus-Neutralisation im Interferenz-Ansatz 20

Prüfung der Seren schutzbehandelter Personen 21

Diskussion 28

Zusammenfassung 32

Literaturnachweis 33

Einleitung

Seit Pasteur mit seinen Mitarbeitern Chamberland und Roux in den Jahren 1880 bis 1884 erstmals ein Verfahren der aktiven Immunisierung gegen Tollwut erarbeitet hat, sind große Anstrengungen unternommen worden, Wirksamkeit und Verträglichkeit des Impfstoffes zu verbessern.

1906 entwickelten Fermi, 1919 Semple, 1925 Hempt noch heute gebräuchliche Vakzinetypen. 1962 prüften Ruegsegger und Sharpless eine HEP (High egg passage) Flury-Rabies-Vakzine, die in 193 Kückenembryopassagen sowie 6 Hünerfibroblastengewebekulturpassagen entstanden war. 1963 veröffentlichten Kissling und Reese ihre Versuche mit einer gehirngewebsfreien Antirabiesvakzine, deren Antigen von Hamsternierengewebekulturen gewonnen war und 1967 berichteten Sikes und Larghin über eine gereinigte Antirabiesvakzine, deren Antigen tollwutinfizierten Mäusegehirnen entstammte, die chromatografisch fraktioniert worden waren.

Trotzdem ist eine wirklich sichere Schutzbehandlung der Tollwut bis heute auf dem Wege der aktiven Immunisierung nicht möglich, wobei einschränkend gesagt werden muß, daß die neuest entwickelten Vakzinetypen bislang noch nicht genügend erprobt werden konnten.

Die Hygienische Rundschau von 1894 enthält einen detaillierten Erfahrungsbericht mit der Pasteur'schen Schutzimpfung, durchgeführt in russischen Impfinstituten. Danach wurden in den Jahren 1890/91 6305 Personen geimpft, von denen 77 = 1,2 % verstarben, wobei die Mortalität der von Hunden Gebissenen 0,73 %, die der von Wölfen Gebissenen 9,5 % betrug.

Von Hempt wird die Komplikationsrate der Pasteur'schen Schutzimpfung mit 1 : 2000 bis 1 : 5000 angegeben, das

entspricht 0,5 bis 0,2 pro 1000. Die WHO-Statistik der Jahre 1962/63 erfaßt 964.931 gegen Tollwut geimpfte Personen aus 63 Ländern. Davon erlagen 430, das entspricht 0,45 ‰ der Infektion. Die Impfschäden werden mit 65 Paralysezwischenfällen angegeben, das entspricht 0,067 ‰. Abweichend davon gibt Kollmannsberger 1966 die Häufigkeit postvakzinaler Lähmungen mit 0,77 bis 1,17 ‰ an, während Gildemeister die Komplikationsrate nach Hemptvakzination mit 0,1 bis 0,2 ‰ beziffert. Das Institut für Tollwutschutzimpfung in Potsdam ermittelte für die Jahre 1962 bis 64 eine Neurokomplikationsrate nach Hemptvakzination von 1 : 3100. In Übereinstimmung hierzu wird in der Bundesrepublik ein Fall schwerer Neurokomplikationen auf 3000 bis 4000 Impfungen mit der Hempt-Vakzine beobachtet (Ott, 1967). 57 % dieser Impfschäden äußern sich als lumbodorsale Myelitis, weiterhin als Polyneuritis, seltener Mononeuritis, sowie als Meningoencephalitis mit einer Mortalität von 15 bis 20 % (Kollmannsberger, 1966). In der Bundesrepublik war bei etwa 40 000 und in der DDR bei etwa 90 000 Impfungen bis 1968 kein einziger Todesfall zu beklagen, der zu Lasten der Impfung gefallen wäre. Daneben sind leichte und rasch vorübergehende Beeinträchtigungen wie Müdigkeit, Kopfschmerzen, Juckreiz sowie Erythem und Berührungsempfindlichkeit im Bereich der Injektionsstellen häufig.

Daraus geht hervor, daß die aktive Tollwutschutzimpfung mit einer relativ hohen Komplikationsrate belastet ist, die nur durch eine eindeutig nachgewiesene Schutzwirkung gegenüber der Tollwuterkrankung selbst verantwortet werden kann.

In der Bundesrepublik wird fast ausschließlich die Tollwutvakzine nach Hempt der Behring-Werke AG verwendet. Sie besteht aus einer 10 %igen homogenisierten Suspension aus ätherbehandelter Gehirn- und Marksubstanz von Kaninchen, die mit Virus fixe (Stamm Novi Sad) infiziert

worden sind und enthält 1 % Phenol. Das Virus fixe ist inaktiviert. Die Applikation von jeweils 4 ml erfolgt im Abstand von 24 Std. subkutan, meist in die Bauchhaut. Bei leichten bis mittelschweren Verletzungen werden 5 aufeinanderfolgende Injektionen, bei schweren Bissverletzungen 4 Wochen später eine Boosterinjektion empfohlen. Dabei handelt es sich um eine aktive Immunisierung, welche infolge der langen Inkubationszeit der Tollwuterkrankung möglich ist. Im Tierversuch läßt sich eine solche postinfektionelle Tollwutprophylaxe nicht begründen, selbst wenn bereits eine Stunde nach der Infektion mit der Vakzination begonnen wird (Kuwert, 1967).

So sind alle Verfahren, die zur Wirksamkeitsprüfung der Tollwutvakzine herangezogen werden, präinfektionelle Schutzversuche, wie der von Habel angegebene und nach ihm benannte Test. Hierbei wird die Infektiosität eines standardisierten Rabiesvirusstammes (CVS) durch intracerebrale Beimpfung in 2 Gruppen weißer Mäuse titriert, wovon 1 Gruppe in 14 davor liegenden Tagen 6 Vakzinedosen intraperitoneal appliziert erhalten hat (Habel, 1966). Aus der Titerdifferenz wird auf die antigene Wirksamkeit geschlossen. Entsprechend wurde die Hempt-Vakzine von Schindler und Wöhle an Hunden erprobt und für wirksam erachtet (Schindler, 1956; Wöhle, 1965). Steck und Schneider kamen in Mäuseversuchen zu dem Ergebnis, daß Impfdosis und Schutzwirkung in direktem Zusammenhang stehen, wobei der besondere Schutz aufeinanderfolgender Impfungen betont wird.

Zwar werden den humoralen Antikörpern bei der Rabiesimmunität nicht die zentrale Rolle beigemessen (Schindler, 1963), doch liegt in der Ausbildung neutralisierender Antikörper bei Geimpften die Grundlage zur objektiven Einschätzung der Antigenität einer Vakzine (Kuwert,1967). Selimov et al. hat 1959 an 6 Personen, die nach schwerer Infektgefährdung mit der Fermi-Vakzine geimpft worden

waren, neutralisierende Antikörper im Mäuseschutzversuch bestimmt. Jede Person erhielt insgesamt 276 ml der Vakzine (5 %ige Gehirnsuspension) im Verlauf von 54 Tagen. 17 Tage nach Impfbeginn lagen die Titer zwischen 1/27 und 1/58. 11 Tage später erreichten die Titer Werte zwischen 1/116 und 1/225. 15 Monate nach Vakzinationsbeginn konnten noch Titer zwischen 1/15 und 1/51 bestimmt werden. Keine der gebissenen Personen starb.

Starke und Winkler haben 1954 hervorgehoben, daß bei einer Inkubationszeit unter 30 Tagen keine Rettung durch eine Wutschutzbehandlung möglich sei. Sie stellten fest, daß von 417 Pat. mit Kontakt sicher tollwutkranker Tiere nach Impfung mit der Semple-Vakzine kein Erkrankungsfall eingetreten und bei etwa 3 000 Behandelten kein Impfzwischenfall zu beobachten war. 1957 führten Sartorius, Starke und Winkler den Begriff der "Überlebensfrist" ein (Zeit zwischen der Infektion bis zum Tode). Werden Todesfälle in diesem Zeitraum (33 Tage) in Abrechnung gestellt, liegt die Mortalität im Durchschnitt unter 0,1 %. Dieser Prozentsatz wird bei Verwendung der Semple- oder Hempt-Vakzine nicht überschritten, das bedeutet, daß die beiden genannten Vakzinen den internationalen Maßstäben gerecht werden.

Eichwald hat die Rolle der Antikörper nach Hempt-Vakzinierung bei einem großen Personenkreis in Anwendung der Komplementbindungsreaktion (KBR) untersucht. 24 Tage nach Impfbeginn, in seinen Versuchen zum Zeitpunkt der Booster-Injektion, besaßen 81,1 % der Personen, die 6 Injektionen und 63,1 % der Personen, die 3 Injektionen erhalten hatten, komplementbindende Antikörper. Am 90. Tag konnten in den entsprechenden Gruppen in 95,7 bzw. in 79,7 % Antikörper nachgewiesen werden. Eigenartigerweise lag der Prozentsatz in der Gruppe, die 5 + 1 Injektion erhalten hatte, höher, als in der Gruppe mit 6 + 1 Injektion. Nach präinfektioneller Vakzination von

Kaninchen waren nach 24 Tagen sowohl neutralisierende als auch komplementbindende Antikörper nachweisbar. Die Infektion selbst zeigte eine Stimulation der Antikörperbildung. Eichwald sieht in diesen Experimenten die Schutzkraft der Hempt-Vakzine erwiesen, zumal bei 60 000 lege artis geimpften Personen in der DDR, trotz erheblicher Infektionsgefährdung, kein Impfdurchbruch vorgekommen sei (Eichwald, 1963).

Atanasiu, Dean, Habel, Kaplan, Koprowski, Lépine und Serié haben neutralisierende Antikörper nach mehreren Behandlungsmodifikationen mit Serum und Vakzine an Personengruppen untersucht. Als Vakzine diente phenolbehandeltes Kaninchengehirn vom Semple-Typ, als Serum Antirabiesserum vom Pferd aus dem Institut Pasteur. 14 Tage nach Vakzine allein konnten bei fast allen Personen neutralisierende Antikörper festgestellt werden. Zur Überbrückung der Latenzzeit von 7 bis 10 Tagen, bis Antikörper erkennbar werden, verabreichten sie zusammen mit der ersten Vakzinegabe Antirabiesserum. In der Beobachtungszeit von 50 Tagen lagen die Titer erheblich unter denen nach alleiniger Vakzination, weshalb bei der kombinierten Behandlung Booster-Injektionen erforderlich sind (Atanasiu et al.1967).

Material und Methoden

Insgesamt wurden 40 Seren von Personen, die gegen Tollwut aktiv immunisiert worden waren, von August 1965 bis März 1968 gesammelt. Der größte Teil entstammt dem Zuständigkeitsgebiet der Tollwutberatungsstelle Stuttgart, Bürgerhospital, Med. Klinik I. Zwei Seren an Tollwut erkrankter und verstorbener Personen hat der ärztliche Direktor dieser Klinik, Herr Prof. Dr. H. Ott, aus Thailand mitgebracht. Zwölf Seren sind in der Gegend um Wangen i.Allgäu abgenommen worden, nachdem dort ein größerer Personenkreis nach dem Freibankverkauf von Rindfleisch einer tollwutkranken Kuh geimpft worden war.

Die Untersuchungen erstreckten sich über einen Zeitraum von 2 1/2 Jahren. Während dieser Zeit wurden die Seren bei -20° C aufgehoben, wobei nur ausnahmsweise ein Serum zweimal aufgetaut werden mußte, da jedes Serum in mehreren kleinen Portionen eingefroren worden war. Die Personen waren, bis auf die in Thailand Verstorbenen, ausnahmslos mit der Rabiesvakzine nach Hempt der Behring-Werke AG, Marburg geimpft.

Von 28 Personen war bekannt, ob ihnen lediglich 5 Dosen zu je 4 ml in 5 aufeinanderfolgenden Tagen oder zusätzlich eine Boosterinjektion etwa 4 Wochen später injiziert worden war.

Die Verabreichung der Boosterinjektion scheint häufig vom Ermessen des impfenden Arztes abzuhängen. So wurde bei etwa der Hälfte der Personen, die an der Verarbeitung des Fleisches sowie des Gehirnes der tollwutkranken Kuh beteiligt war, die Boosterinjektion unterlassen, obgleich anamnestisch gerade diese Einteilung nicht zu begründen war. Eine Person hatte 5 Injektionen etwa 18 Monate und 2 Injektionen etwa 6 Monate vor der Blutentnahme erhalten.

Der Zeitraum von der ersten Vakzineinjektion bis zur Blutentnahme schwankte zwischen 5 Tagen und 32 Wochen, wobei die meisten Blutentnahmen in der 12. bis 17. Woche, also etwa 80 bis 120 Tage nach der ersten Injektion erfolgten. In diese Zeit fallen die höchst erreichbaren Titer (Eichwald, 1963).

Untersuchungen der indirekten Immunfluoreszenz

Große Anstrengungen wurden unternommen, gegen Rabies gerichtete Antikörper im Serum rabiesschutzgeimpfter Personen mit dem indirekten Fluoreszenztest nachzuweisen. Dieser Test wurde 1958 von Goldwasser und Kissling auf dem Gebiet der Rabiesimmunologie entwickelt. 1963 untersuchten Thomas, Sikes und Ricker die Empfindlichkeit dieses Antikörpernachweises im Vergleich mit dem Serumneutralisationstest, in einer von ihnen modifizierten Methode. Sie fanden heraus, daß der IFRA-Test (indirect fluorescent rabies antibody test) empfindlicher ist als der SN-Test (Serumneutralisations-Test), was mit der Sichtbarmachung der Antigen-Antikörper-Reaktion, sowie der Erfassung mehrerer Rabiesantigenkomponenten zu erklären versucht wurde. 1965 wurden diese Ergebnisse von Gipsen und Saathof mit einer geringgradig modifizierten Methode bestätigt. Sie konnten bereits 13 bis 17 Tage nach Beginn der Impfserie, bestehend aus 14täglichen Injektionen von 2 ml einer 5 %igen UV-bestrahlten und lyophilisierten infizierten Mäusegehirnsuspension, Antikörper mit Hilfe der Immunfluoreszenz bis zu einer mittleren Serumverdünnung von 1 : 96 nachweisen, wobei noch ein leichter Anstieg bis 1 : 128 in den nächsten 4 bis 8 Wochen zu verzeichnen war.

Die Methode, mit der wir den Antikörpernachweis führen wollten, wurde 1965 von Peck beschrieben. Sie stellt eine Modifikation des von Thomas, Sikes und Ricker beschriebenen

Arbeitsganges dar, wobei die größere Sensibilität des IFRA-Testes gegenüber dem SN-Test neu hervorgehoben wurde. Die Versuchsanordnung soll kurz beschrieben werden: Als Antigen dienen Tupfpräparate tollwutinfizierter Gehirne erwachsener weißer Mäuse, die diesen im Zustand schwerster Erkrankung entnommen und nach Spülung in phosphatgepufferter Kochsalzlösung (PBS), pH 7,6, bei -70° C in geschlossenen Glasröhrchen bis zum Versuchstag aufgehoben werden. Ebenso werden Gehirne gesunder Mäuse zur Kontrolle bereit gestellt. Im Gegensatz zu Peck verwendeten wir Thomas et al. folgend, zur Infektion der Mäuse zunächst Strassenvirus; später gingen wir auf einen Rabies-Flury-Virusstamm über. Während des Auftauens wurden die Gehirne mit dem Skalpell durch Querschnitte in 4 Portionen aufgeteilt, anschließend pro Schnittfläche 4 zarte Abdrücke auf gesäuberte Objektträger getupft, je Objektträger zwei. Nach Lufttrocknen werden sie bei -20°C in Azeton fixiert. In der Zwischenzeit werden die bei -20° C eingefrorenen Seren aufgetaut und 30 Min. bei 56° C inaktiviert. Jedes Serum wird im Verhältnis 1 : 5 und 1 : 10 mit 10 %iger Normalmäusegehirnsuspension in 10 %iger Eigelb-PBS-Lösung (NMB5 bzw. NMB 10) und 1 : 5 mit 20 %iger infizierter Mäusegehirnsuspension (IMB 20) verdünnt. Diese Gemische werden 30 Min. bei 37° C der Inkubation überlassen.

Die Mäusegehirnabdrücke, deren Antigengehalt vorher mit Hilfe fluoreszierender Antikörper nach L.G. Schneider nachgewiesen worden war, werden nach Fixierung und anschließender Lufttrocknung je mit 2 Tropfen der Serummäusegehirngemische beschickt, so daß pro Serum 3 infizierte Gehirnabdrücke, sowie zur Kontrolle ein nicht infizierter Gehirnabdruck mit dem Serum-NMB 10-Gemisch, bedeckt sind. Nach Inkubation von 30 Min. bei 37° C in feuchter Kammer werden die Präparate 10 Min. in PBS gewaschen. Es folgt die spezifische Fluoreszenzfärbung, wobei auf jeden Gehirnabdruck 3 Tropfen einer Farblösung gebracht werden, bestehend aus 1 Teil Antihumanglobulin,

konjugiert mit Fluoresceinisothiocyanat (FITC), 3 Teilen Rhodamin-bovin-Albumin, 4 Teilen NMB 20. Anschließend werden die Präparate 30 Min. bei 37° C inkubiert, 10 Min. in PBS gespült, luftgetrocknet und mit gepuffertem Glycerin, pH 8,5, eingebettet.

Verwendet wurde das FITC-konjugierte Antihumanglobulin von Ziegen der Firma Sylvana Chemical Company Orange, New Yersey, später das Antihumanplasmaprotein-Serum vom Kaninchen, FITC-konjugiert, der Behring-Werke AG. Das Rhodamin-Albumin bezogen wir von der Microbiological Associates Bethesda, Maryland. Zur mikroskopischen Beurteilung diente das große Fluoreszenzmikroskop der Firma Zeiss mit der Höchstdruck-Quecksilber-Dampflampe HBO 200 W:

Der Grundton des Bildes ist ziegelrot. Konturen heben sich durch intensivere Färbung oder Lücken ab. So wird der Hirnabdruck erkennbar, der ein- bis mehrschichtige Zellagen aufweist. Die Grünfluoreszenz des FITC-Farbstoffes, der die Antikörper markieren soll, ist nur als undifferenzierbarer Schimmer vorhanden. Ein spezifischer Unterschied zwischen den einzelnen Präparaten ist nicht objektivierbar.

So bestand die erste Modifizierung konsequenterweise in einer Abschwächung der Rhodamingegenfärbung. Das Rhodamin-Albumin wurde 1 : 4 in PBS vorverdünnt. Wie zu erwarten, stellte sich die grüne Fluoreszenz des FITC vorherrschend dar. Trotzdem war eine spezifische Fluoreszenz, die den Antigen-Antikörper-AntiAntikörper-Komplex darstellen sollte, bei Gegenüberstellung der positiven und negativen Präparate nicht auszumachen. Selbst ein von Dr. Peck lyophilisiert zugesandtes Serum, das von ihm positiv befundet worden war, verhielt sich entsprechend den von uns gesammelten Seren. Sämtliche Versuche wurden zum Ausschluß technischer Mängel mehrfach wiederholt.

Verbesserung der Antigenpräparation

Unbefriedigend erschien bei dieser Versuchsanordnung zunächst die Antigenpräparation in Form der Mäusegehirntupfpräparate, da die einzelnen Abdrücke ungleich Antigen enthalten, häufig bereits das Auffinden der spezifischen Fluoreszenz in der direkten Nachweismethode erst nach längerem systematischem Suchen gelingt.

So hatten die nun folgenden Versuchsreihen eine Verbesserung der Antigenpräparation zum Ziel. Um weniger gefährlich arbeiten zu müssen, wurde hierzu ein Rabies-Flury-Stamm verwendet, der etwa 70mal im Hühnerei passagiert und uns von Dr. L.G. Schneider von der Bundesforschungsanstalt für Viruskrankheiten der Tiere (BFA), Tübingen, in der zweiten Mäusegehirnpassage überlassen worden war. Dies ist zulässig, da Rabiesvirusstämme unterschiedlicher Herkunft in ihren antigenen Eigenschaften weitgehend übereinstimmen (Johnson, 1965; Koch, Konnerth, 1966; Sartorius et al. 1957), jedenfalls sind antigene Differenzen zwischen einzelnen fixierten Stämmen nur bei Verwendung starmspezifischer Antiseren nachweisbar (Kuwert, 1969). Das Virus wurde durch intracerebrale Inokulation in 4 bis 5 Wochen alten NMRI Mäusen vermehrt, wobei sich ein Titer von $10^{-4.0}$ LD_{50} pro 0,015 ml ergab. Weiterhin wurde das Virus durch Verimpfen auf die Chorioallantoismembran 7 Tage alter Hühnerembryonen vermehrt, wie erstmals 1938 von Kligler und Bernkopf beschrieben, dann durch Dottersackinokulation, entsprechend den Angaben, die Koprowski und Cox über hühnerembryo-adaptierte Rabiesviren gemacht haben (Cox, Koprowski, 1948; Lenette, 1964). Nach 9-tägiger Bebrütungszeit wurde ein Titer von $10^{-4,1}$/0,03 ml, bestimmt durch intracerebrale Beimpfung 3 - 4 Wochen alter NMRI Mäuse, erreicht. Beide Chargen wurden als Antigenpool in 2 bzw. 5 ml-Glasampullen eingeschmolzen und bei -70°C bereit gehalten.

Da Tollwutviren sich in Gewebekulturen verschiedenster Provenienz vermehren (Wiktor, 1965; Kissling, Reese,1963), war der Gedanke naheliegend, diesen an den Hühnerembryo adaptierten Stamm in Hühnerembryozellkulturen anzureichern. Fibroblasten wurden durch Trypsinieren mit der Schere zerkleinerter, 9 Tage alter Hühnerembryonen gewonnen, nachdem Augen, Schnabel, Eingeweide sowie distale Extremitätenenden verworfen worden waren, entsprechend üblichen Laboratoriumsmethoden (Parker, Hoeber, 1961). Als Aussaatmedium wurde Hanks Ly + 10 % Kälberserum, als Erhaltungsmedium Hanks Lösung mit Albuminhydrolysat-Hefeextrakt + 5 % Kälberserum verwandt. Beimpft wurde entsprechend den Untersuchungen von Wiktor vor der Aussaat. Die Zellzüchtung erfolgte bei 35 - 37°C in Gewebekulturröhrchen, die am hinteren Viertel, hinter einem kleinen Wulst, eine ebene Fläche besitzen ("Leighten tubes"). Darauf wurden halbierte Deckgläschen nach gründlicher Reinigung und Entfettung in Äther-Alkohol und anschließendem Abflammen, als Zellträger und zur weiteren Bearbeitung der Kulturen gebracht.

Die in etwa 0,5 %iger Suspension mitsamt dem Antigen ausgesäten Zellen waren nach 18 bis 24 bis 36 Stunden zu Monolayerkulturen ausgewachsen. Nach etwa 48 Stunden wurde das Medium gewechselt und nach weiteren 48 Stunden die Kulturen den Röhrchen entnommen, luftgetrocknet, in Azeton bei -20°C fixiert. Hierzu wurden aus feinmaschigem Messingdrahtgeflecht kleine Körbe angefertigt, die 10 bis 12 der halbierten Deckgläschen aufnehmen konnten. Die direkte Antigenfärbung wurde mit FITC-markierten Tollwutantikörpern nach Schneider vorgenommen, zunächst mit einem von ihm zur Verfügung gestellten Konjugat, später mit dem selbst konjugierten Antirabiesimmunserum der Behring-Werke.

In dieser Versuchsanordnung konnte der Anteil der spezifisch fluoreszierenden Zellen nicht über etwa 5 % gesteigert werden, da eine höhere Beimpfung als 1 g infiziertes

Embryogewebe bzw. Mäusegehirn auf 40 ml 0,5 %iger Zellsuspension wegen der dann auftretenden toxischen Zellschädigung nicht möglich war. In den ersten 36 Stunden konnte eine spezifische Fluoreszenz überhaupt nicht nachgewiesen werden, von da an war bis etwa 72 Stunden eine Zunahme zu beobachten. Nach etwa 96 Stunden starben die Zellen, beimpft und unbeimpft, ab.

Es wurde deshalb versucht, durch Passagieren der Zellen einen chronisch infizierten Zellstamm zu erhalten, entsprechend der Mitteilung von Wiktor, der an Hamsternieren- sowie Humandiploid-Zellkulturen durch mehrere Passagen einen erheblichen Zuwachs an fluoreszierenden Zellen beobachten konnte. Zu diesem Zweck wurden sowohl infizierte als auch nicht infizierte Fibroblastensuspensionen in 200 ml fassende Vierkantflaschen ausgesät, pro Flasche etwa 14 ml, die nach 3 Tagen, nachdem dichte Monolayerkulturen gewachsen waren, mit Trypsin resuspendiert und nach Zentrifugieren auf 2 neue Flaschen aufgeteilt wurden.

Dabei ergab sich Folgendes: Die Zellen wurden ab der 2. Passage morphologisch einheitlich spindelförmig, häufig fischzugartig angeordnet. Steriler Zelldetritus, bei Primärkulturen fast unvermeidbar, waren durch das Passagieren ausgeschwemmt. Bis zur 4. Passage war eine Zunahme der spezifischen Fluoreszenz bis zu etwa 15 % zu verzeichnen. Nach weiteren Passagen verschwand sie völlig.

Der Versuch die RNS-haltigen Rabiesantigene mit der Acridinorangefluorochromierung sichtbar zu machen, wie von Crowther und Melnick 1961 beschrieben, ergab keine objektivierbare Differenz zwischen infizierten und nicht infizierten Kulturen.

Um eine weitere Zunahme des spezifisch fluoreszierenden Zellanteiles zu erreichen, wurde die Eigenschaft von DEAE-Glukose (Diäthylaminoäthyl-Dextran, ein Polyion, bezogen von der Pharmacia, Uppsala, Schweden) an Hühnerfibroblastenzellkulturen untersucht. Kaplan, Wiktor, Maes,

Campbell und Koprowski haben an verschiedenen Zellsystemen beobachtet, daß bei Beimpfung ausgewachsener Monolayerkulturen durch Zugabe von 10 bis 50 µg DEAE-Glukose/ml Inokulum die Infektion der Zellen eine erhebliche Steigerung erfahren hatte (Kaplan et.al., 1967). Dieser Befund konnte in gleicher Versuchsanordnung an Hühnerfibroblasten nicht bestätigt werden, zumal ausgewachsene Hühnerfibroblastenkulturen normalerweise mit nur geringem Erfolg mit Rabiesvirus infiziert werden können. Deshalb wurde in einer Modifikation DEAE-Glukose der infizierten Zellsuspension in gleicher Konzentration zugesetzt. Nach einstündiger Inkubation bei 37°C wurden dann die Zellen abzentrifugiert und ausgesät. Das Ergebnis war gleichermaßen enttäuschend.

Hühnerfibroblasten schienen als Antigenträger nicht das geeignete Zellsystem zu sein, um eine erhebliche Verbesserung der Antigenpräparation gegenüber Mäusegehirntupfpräparaten zu erhalten.

Ein neues Zellsystem, das sich zur Rabiesvirusvermehrung besonders eignet, wurde deshalb erprobt: BHK-Zellen (Baby Hamster Kidney), die wir von Herrn Dr. Schneider und Herrn Dr. Schwöbel aus der Bundesforschungsanstalt für Viruskrankheiten der Tiere, Tübingen, erhielten. Diese Zellen sollen nach Infektion mit Tollwutvirus sowie 4 bis 6 Passagen eine 100 %ige Zellinfektion aufweisen.

In den eigenen Versuchen konnte zwar eine 100 %ige Fluoreszenz nicht erreicht werden, doch zeigte nach 4 Passagen jede 2. bis 3. Zelle deutlich spezifisch apfelgrün fluoreszierende, intracytoplasmatisch gelegene, unterschiedlich große und geformte Partikel. Hiervon wurden, wie auch von den Hühnerfibroblasten, Deckglaspräparate angefertigt, die nach Fixierung in Azeton bei -20°C bei gleicher Temperatur für den indirekten Antikörpernachweis aufgehoben wurden. Bei dieser Lagerung bleiben die Präparate bis zu 2 Monaten gleich gut brauchbar (Pittmann et al., 1967). Um den Unsicherheitsfaktor, den die Effizienz der käuflichen FITC-konjugierten Antihumanglobuline

für die indirekte Antikörpermarkierung darstellt, auszuschalten, wurde FITC-konjugiertes Antihumanglobulin in Mäuseascites nach der 1967 von Sommerville angegebenen Methode gewonnen. Der erreichte Titer, bestimmt durch die Gelpräzipitation nach Ouchterlony betrug 1 : 32, während das Antihumanglobulin der Behringwerke Präzipitationslinien nur bis zu einer 1:2-Verdünnung aufwies.

Damit waren die Voraussetzungen, gegen Rabies gerichtete Antikörper im Serum geimpfter Personen mit dem indirekt fluoreszierenden Antikörpertest zu erfassen, wesentlich verbessert.

Indirekte Immunfluoreszenz mit verbesserten Antigenen

Die Versuche wurden entsprechend den Angaben von Peck wiederholt, wobei als Antigenpräparation infizierte Mäusegehirnabdrücke, infizierte und passagierte Hühnerfibroblasten- sowie infizierte und passagierte BHK-Zellkulturen dienten. Zur Färbung wurde das selbst hergestellte Antihumanglobulin aus Mäuseascites verwandt, das Rhodamin-Albumin entsprechend früheren Ergebnissen 1 : 4 vorverdünnt.

Die Betrachtung im Fluoreszenzmikroskop zeigte ausgewogen gefärbte, morphologisch den Zelltypen entsprechende Präparate mit deutlich erkennbaren Zellen, abgrenzbaren Zellkernen sowie Kernkörperchen, besonders in BHK-Zellen und Fibroblasten.

Apfelgrün fluoreszierende Partikel intracytoplasmatisch als auch in den Mäusegehirntupfpräparaten extrazellulär gelegen, ließen den gesuchten Komplex vermuten, waren jedoch nicht objektiv unterscheidbar auch in den nicht infizierten Objekthälften vorhanden. Entsprechendes zeigte sich in den Präparaten, die mit Rabiesvirus abgesättigten

Seren, sowie mit Seren nicht geimpfter Personen angefertigt worden waren.

Da nach mehrfachen Wiederholungen kein Ergebnis zu erzielen war, wurden die Versuche abgebrochen.

Komplementbindungsreaktion und Serumneutralisationstest

Zum Antikörpernachweis wurden nun 2 Routinemethoden herangezogen, die Komplementbindungsreaktion, sowie der Serumneutralisationstest.

Letzterer wurde durchgeführt entsprechend den Empfehlungen des WHO-Komitees für Rabies (Atanasiu et al., 1956). Als Antigen wurde ein Rabiesvirusstamm verwendet, der nach 70 Eipassagen 2 Mäusegehirn-, 1 Ei- sowie 3 weitere Mäusegehirnpassagen erfahren hatte. Sein Titer betrug, berechnet nach Reed und Muench $10^{-4,66}$ LD_{50}/0,02 ml. Wurde dasselbe Antigen, entsprechend den Inkubationszeiten im Neutralisationstest von 1 Stunde bei 37°C sowie 1 Stunde bei 4°C vorbehandelt, so sank der Titer auf $10^{-2,5}$. Da sich herausstellte, daß die neutralisierenden Antikörpertiter sehr niedrig lagen, genügte eine einzige Serumverdünnung auf eine konstante Virusmenge, im Versuch 46 LD_{50}/0,02 ml, einwirken zu lassen.

Die für 30 Minuten bei 56°C inaktivierten Seren wurden zunächst 1:2 mit PBS verdünnt, hierzu ein gleiches Volumen 1:5 in PBS+2 % inaktiviertes Pferdeserum verdünnte, infizierte Mäusegehirnsuspension pipettiert, deren Titer wie oben angegeben bestimmt worden war. Somit war im Versuchsansatz die Endverdünnung des Serums 1:4, Die Virusmenge, bezogen auf 0,02 ml, entsprach $10^{1,5}$ LD_{50}.

Nach der Inkubationszeit von 1 Stunde bei 37°C und 1 Stunde bei 4°C wurden pro Serum 4 etwa 3 Wochen alte, männliche

NMRI-Mäuse durch intracerebrale Inokulation von 0,02 ml beimpft. Im gleichen Ansatz erfolgte die Kontrolltitration des Antigens zur Bestimmung der tatsächlich im Versuch verwendeten Antigenmenge sowie weitere Kontrollen unter Verwendung von Seren nicht gegen Tollwut geimpfter Personen. Die Beobachtungszeit betrug 16 bis 18 Tage. Die Berechnung des Neutralisationstiters erfolgte nach Reed und Muench. Er gibt an, wie viele LD_{50}-Einheiten von 0,02 ml des geprüften unverdünnten Serums neutralisiert werden.

Die Komplementbindungsreaktion wurde in der Mikromethode mit dem Microtiter Cooke Engineering Co, Medical Research Division, Alexandria, Virginia, durchgeführt.

Zur Gewinnung eines einwandfrei komplementbindenden Antigens wurden die Gehirne mit dem Rabies-Flury-Stamm infizierter, 6 bis 8 Wochen alter NMRI-Mäuse nach Zerkleinerung im Mörser mit Sand mit Veronalpuffer 1:10 (feuchtes Gewicht) verdünnt, 3 mal im Trockeneis-Azetonbad eingefroren und auf Zimmertemperatur aufgetaut, anschließend 30 Min. bei 3 000 UpM zentrifugiert (Schindler, 1962). Der Überstand diente als Antigen, das bis zur Verwendung in 2 ml-Glasampullen eingeschmolzen und bei -70°C aufbewahrt wurde. Sein Titer betrug in jungen erwachsenen NMRI-Mäusen bestimmt $10^{-4,7}LD_{50}/0,02$ ml. In gleicher Weise wurden Gehirne gesunder Mäuse als Kontrollantigen hergestellt. Zur Verdünnung aller Reagenzien wurde Veronalpuffer verwendet. Das hämolytische System wurde so angesetzt, daß in 0,2 ml der 2 %igen Hammelerytrocytensuspension 2 hämolysierende Einheiten vorhanden waren. In der Komplementtitration wurde unter Verwendung der infizierten als auch der nicht infizierten Antigene die mindestlösende Verdünnung bestimmt. Im Test wurde mit einem 100 %igen Komplementüberschuß gearbeitet. Nachdem die Seren 30 Minuten bei 56°C inaktiviert worden waren, wurden Verdünnungen von 1:4 bis 1:256 direkt auf den Micotiter-Platten vorgenommen,

pro Verdünnung das gleiche Volumen des 1:4 vorverdünnten Antigens sowie das Komplement aufgetropft. Dabei wurde jedes Serum sowohl mit dem infizierten als auch dem nicht infizierten Antigen angesetzt, die Komplementrücktitration mit beiden Antigenen vorgenommen. Seren nicht geimpfter Personen wurden zum Vergleich mitgeprüft.

Die Komplementbindung erfolgte über Nacht bei +4°C, anderntags wurde das auf 37°C erwärmte hämolytische System hinzugegeben und die Hämolyse im Brutschrank nach 15 bis 30 Minuten, entsprechend der Reaktionszeit im Komplementrücktitrationsansatz, beurteilt. Ausgewertet wurden nur die Seren, die keine Komplementeigenbindung besaßen und deren Titer im Leerantigenansatz kleiner als 4 war.

Untersuchungen zur Interferenz von Rabiesviren

Neben diesen serologischen Standardmethoden wurde noch in einem weiteren Verfahren der Nachweis gegen Tollwut gerichteter Antikörper im Serum wutschutzgeimpfter Personen erbracht. Es gründet sich auf die interferierende Eigenschaft der Rabiesviren, die Kaplan, Wecker, Forske und Koprowski 1960 demonstriert haben. Unter Interferenz wird ein Vorgang verstanden, der die Vermehrung von Viren in Zellen behindert, die vorher mit dem gleichen oder einem anderen Virus infiziert worden waren. Das wirksame Agens ist unter Berücksichtigung definierender Eigenschaften das Interferon. Besonders empfindlich gegen Interferon sind Arboviren, die zudem die Eigenschaft besitzen, ihre Vermehrung in vielen Zellsystemen durch Ausbildung eines cytopathischen Effektes (CPE) anzuzeigen (Lockart, 1966). Damit sind sie besonders geeignet als Indikator die Vermehrung bzw. Interferoninduktion solcher Virusstämme anzuzeigen, die selbst keinen CPE bewirken. Selimov et al. zeigte, daß die Infektion von

Hühnerfibroblasten mit einem Rabies-Flury-Virusstamm (HEP) mit der Vermehrung von Western Equine Encephalitis-, Pseudorabies-, Newcastle Disease-, Vaccinia- und einem Parainfluenza-Stamm (Sendai) interferiert (Selimov et.al., 1965). Dieses Phänomen nutzte er zur Titration von Rabiesviren in Zellkulturen aus. Der von Selimov geführte Spezifitätsnachweis, die Interferenz durch Absättigung der Rabiesviren vor der Infektion mit 1:100 verdünntem Antirabiesgammaglobulin zu verhindern, wurde zu einem Verfahren ausgearbeitet, das zur Erkennung gegen Rabies gerichteter Antikörper in Humanseren verwendet werden konnte.

Das System bestand 1. aus Hühnerfibroblasten, in normalen Gewebekulturröhrchen als 0,5 %ige Zellsuspension ausgesät; das entspricht einer Zelldichte von 2,4 bis 2,7 Mill. Zellen/ml, 2. dem bereits angegebenen Rabiesvirus-Pool, der einen Titer von $10^{-4,7} LD_{50}/0,02$ ml besaß, 3. dem Challenge Virus aus der Gruppe der Arboviren, von denen das Semliki Forest Virus verwendet wurde. Dieses 1944 in Uganda isolierte Virus ist im Gegensatz zu vielen anderen Arboviren für den Menschen apathogen. Es läßt sich leicht und schnell in Hühnerembryonen, Säuglingsmäusen sowie jungen erwachsenen Mäusen vermehren und zeigt seine Vermehrung in Hühnerembryozellkulturen durch Ausbildung eines cytopathischen Effektes an (Ping-Yao Cheng, 1961): Formveränderung der Zelle, verstärkte Lichtbrechung des Kernes, Kernpyknose, Cytoplasmagranulierung, Zellablösung. Wegen der großen Thermolabilität des Semliki-Forest-Virus mußte die Virussuspension nach dem Auftauen rasch und möglichst im Eisbad verarbeitet werden. Der im Versuch eingesetzte Viruspool, eine 10 %ige Suspension infizierter Säuglingsmäusegehirne in PBS + inaktiviertes Kaninchenserum (30 %) + inaktiviertes Pferdeserum (20 %), bewirkte bei Beimpfung ausgewachsener Hühnerfibroblastenkulturen mit 1 ml Virussuspension in TC 199 (Earls)-Medium der Firma Difco + 1 % Kälberserum nach 32 bis 48 Stunden einen gleichstark ausgeprägten cytopathischen Effekt (CPE) in

der Verdünnung von 10^{-1} - 10^{-6}. Die mit 10^{-7} und 10^{-8} beimpften Kulturen zeigten entsprechende Veränderung in abgeschwächter Ausprägung, während ab der Verdünnungsstufe 10^{-9} ein den nicht beimpften Kulturen entsprechendes Zellbild vorhanden war. Dabei wurde folgende Stadieneinteilung festgesetzt: I: Schwacher CPE an einzelnen Zellen und kleinen Zellgruppen, II: Etwa die Hälfte der Zellen zeigen einen CPE, III: Fast alle Zellen sind betroffen, zusätzlich starke Einzelzellablösung, IV: Der größte Teil der Zellen ist abgelöst.

Im Versuch wurde mit der Verdünnung 10^{-3} gearbeitet. Zunächst wurde das Rabiesvirus mit Hilfe seiner interferierenden Eigenschaft titriert. Die Beimpfung der Zellsuspension erfolgte vor der Aussaat von 10^{-1} bis 10^{-6}. Pro Verdünnungsstufe wurden 5 Röhrchen angesetzt, 8 weitere Röhrchen blieben unbeimpft. Nach 54 bis 62stündiger Bebrütungszeit bei 35 bis 37°C wurde 1 ml des 10^{-3} verdünnten Challenge-Viruspools hinzupipettiert, wobei als Kontrolle 4 der nicht rabiesinfizierten, sowie 1 Röhrchen pro Verdünnungsstufe lediglich mit Erhaltungsmedium beschickt wurden. Nach vollständiger Ausbildung des cytopathischen Effektes in den nur mit Semliki-Forest-Virus beimpften Kulturen wurde abgelesen.

Die 10^{-1} mit Rabies beimpften Röhrchen schieden in der Beurteilung aus, da sie bereits vor Zugabe des Challenge-Virus einen toxisch bedingten CPE aufwiesen, deutlich von dem des Challenge-Virus unterschieden. Die 10^{-2} und 10^{-3} beimpften Kulturen zeigten die gleiche Zellmorphologie wie die nicht infizierten Kulturen, ließen also einen CPE vermissen, der in zunehmender Ausprägung in den 10^{-4} und 10^{-5} mit Rabiesvirus beimpften Kulturen vorhanden war.

Hierbei war das Ergebnis das gleiche, ob das Rabies-Virus sofort nach dem Auftauen oder erst nach Temperaturbehandlung von 1 Stunde bei 37° und 1 Stunde bei 4°C verimpft wurde. Weiterhin konnte festgestellt werden, daß das Challenge-Virus, 18 bis 36 Stunden nach der Zellaussaat

hinzugegeben, in der Ausbildung des CPE nicht behindert wurde.

Das Rabiesvirus war also in der Lage, bis zu einer Verdünnung von 10^{-3} die Vermehrung eines nach bestimmter Zeit zugesetzten Virus zu verhindern. Würden nun die Rabiesviren insgesamt oder zum Teil von Antikörpern besetzt, bevor sie mit den Zellen in Kontakt kommen, wären sie nicht mehr oder zum Teil nicht mehr frei, Interferenz zu bewirken.

Virus-Neutralisation im Interferenz-Ansatz

Die Neutralisation des Rabiesvirus durch Antikörper im Serum geimpfter Personen wurde in folgendem Versuchsansatz geprüft:

0,25 ml hitzeinaktiviertes Humanserum
0,25 ml PBS
0,5 ml Rabiesantigen 10^{-1} bzw. 10^{-2} in PBS +
2 % inaktiviertes Pferdeserum + 400 E/ml Penicillin +
400 Gamma/ml Streptomycin.

Es wurde 60 Minuten bei 37°C, 60 Minuten bei 4°C inkubiert. Darauf wurden 0,8 ml eines jeden dieser Gemische zu 3,2 ml einer 0,6 %igen Zellsuspension gegeben. So ergab sich die gewünschte Konzentration des Rabiesvirus von 10^{-2} und 10^{-3} im Aussaatmaterial, das je auf 4 Röhrchen zu 1 ml-Portionen aufgeteilt wurde. Nach etwa 60-stündiger Bebrütungszeit bei 35 bis 37°C wurde das Challenge-Virus hinzugegeben, ohne das Aussaatmedium zu verwerfen. 24 bis 48 Stunden später wurde die Auswertung vorgenommen. Nur wenn alle Kontrollen korrekt ausfielen, d.h. die je Versuch wiederholte Titration des Antigens bei 10^{-2} und 10^{-3} den CPE des Challenge-Virus verhinderte, der an nicht rabiesinfizierten Kulturen reproduziert wurde, die pro Serum nicht infizierte

Kultur keinen zelltoxischen Effekt zeigte, wurde das Ergebnis bewertet. Dabei galt als Kriterium der Rabiesvirusneutralisation das Auftreten des CPE in einer geringeren Verdünnung als 10^{-4}, wobei ein CPE der Stufe III und IV gefordert wurde.

3 Aussagen konnten gemacht werden: 1. Auftreten des CPE ab der Rabiesviruskonzentration von 10^{-4}: im Serum sind keine Rabiesvirus neutralisierenden Eigenschaften vorhanden. 2. CPE ab 10^{-3}: Rabiesvirusneutralisierende Eigenschaften sind vorhanden. 3. CPE ab 10^{-2}: Rabiesvirus neutralisierende Eigenschaften sind vermehrt vorhanden. Quantitative Aussagen sind nicht möglich, da diesen eine erst zu definierende Maßeinheit zugrunde gelegt werden müßte.

Prüfung der Seren schutzbehandelter Personen

Neutralisierende und komplementbindende Antikörper konnten bereits 12 Tage nach der ersten Impfung in einem Fall nachgewiesen werden.

Von den Personen, die 6 Impfungen erhalten hatten, wurde der höchste SN-Titer von 40 LD_{50} neutralisierenden Einheiten in 0,02 ml 5 Wochen nach Impfbeginn in einem der zur Verfügung stehenden 2 Seren aus dieser Zeitgruppe erreicht. Die individuelle Ansprechbarkeit auf die Impfung zeigte sich darin, daß das andere Serum lediglich 8,4 LD_{50} /0,02 ml neutralisierte. Andererseits zeigte das zuletzt genannte Serum komplementbindende Antikörper bis zu einer Verdünnung von 1:8, während das Serum mit dem höheren SN-Titer bis zu einer Verdünnung von 1:4 Komplement nachweislich zu binden vermochte.

Von den Personen, die 5 Vakzineinjektionen erhalten hatten, konnten in einem Fall 3 Wochen nach Impfbeginn KB-Antikörper bei der 1:4 Serumverdünnung nachgewiesen werden,

während SN-Antikörper fehlten. Diese wurden bei einer anderen Person 4 Wochen nach Impfbeginn mit einem Titer von 8,4 erstmals bestimmt. 13 Wochen nach Impfbeginn waren bei einer Person weder neutralisierende noch komplementbindende Antikörper nachzuweisen, 17 Wochen nach Impfbeginn zeigten 2 weitere Seren einen entsprechend negativen Befund, wobei es sich bei den Serumspendern um Mutter und Tochter handelte. Von diesen 3 Seren zeigte eines der nach 17 Wochen abgenommenen im Interferenztest neutralisierende Antikörper.

Von einer Person mit 6 Vakzineinjektionen wurden 4 Seren in einem Zeitraum von 2 bis 32 Wochen nach Impfbeginn abgenommen und untersucht. 0,02 ml neutralisierten nach 12 Tagen 8,4, nach 5 Wochen 8,4, nach 6 Wochen 40, nach 32 Wochen ebenfalls 40 LD_{50} Einheiten. Komplementbindende Antikörper konnten entsprechend in der Serumverdünnung 1:4, bis 1:8, 1:4 sowie nicht nachgewiesen werden. Der Interferenzansatz war bis auf ein Serum, 5 Wochen nach Impfbeginn abgenommen und vermehrt Antikörper enthaltend, bei den übrigen 3 Seren wegen toxischer Zellschädigung nicht auszuwerten.

Bei 1 Person mit 2 Serumabnahmen sowie 5 Vakzineinjektionen waren 3 Wochen nach Impfbeginn lediglich komplementbindende Antikörper in der Verdünnung 1:4 nachzuweisen, während 2 Wochen später neben den komplementbindenden auch neutralisierende Antikörper auftraten. Da von allen übrigen Personen nur ein Serum zur Verfügung stand, sind Aussagen über den Antikörperverlauf nur mit großer Einschränkung zu machen, zumal die Anzahl der Seren, die im jeweils gleichen Zeitabschnitt nach Beginn der Impfung gewonnen wurden, als repräsentatives Kollektiv zu klein war. Zusätzlich erschwert die individuelle Reaktion der Geimpften entsprechende Angaben. In der 15. Woche nach Impfbeginn konnte bei 5 Personen, denen je 6 Vakzinedosen injiziert worden waren, Blut abgenommen werden. Die neutralisierenden Antikörpertiter

betrugen in 3 Fällen 40, in einem Fall 18,4, in einem Fall 8,4. Komplementbindende Antikörper konnten nur bei einem der Seren mit hohen Titerwerten in einer Verdünnung von 1:4 registriert werden. Im Interferenztest waren in sämtlichen 5 Seren vermehrt Antikörper vorhanden.

Im letztgenannten Test waren 5 Seren wegen reproduzierbar toxischer Zellschädigung nicht auszuwerten. In den übrigen Seren mit nachweisbarem Antikörpertiter im Serumneutralisationstest und in der Komplementbindungsreaktion oder in einer der beiden Reaktionen waren bis auf ein Serum Antikörper vorhanden. Dieses Serum war 3 Wochen nach Beginn der Impfung abgenommen worden, war im SN-Test negativ, zeigte aber komplementbindende Antikörper bei der 4-fachen Serumverdünnung. In den positiven Seren waren bis auf 5 die Antikörper vermehrt vorhanden, wobei eine Übereinstimmung mit höheren bzw. niedrigeren Titern im Tierversuch oder der KBR nicht gegeben war.

In einem Fall mit negativer SN und KBR waren Antikörper im Serum einer mit 5 Vakzinedosen geimpften Person vorhanden.

Von den aus Thailand stammenden Seren hatte das eines 43-jährigen Mannes, der etwa 12 Semple-Vakzine-Injektionen erhalten hatte, und das etwa 4 Wochen nach Impfbeginn abgenommen worden war, keine nachweisbaren komplementbindenden Antikörper bei einem SN-Titer von 18,4 und negativem Ergebnis im Interferenztest. Das Serum eines 12-jährigen Jungen mit 6 Semple-Vakzine-Injektionen wies komplementbindende Antikörper bei der 1:4 Serumverdünnung auf, hatte einen SN-Titer von 40, sowie vermehrt Antikörper im Interferenztest.

Das Serum einer Person, das 6 Jahre nach einem vollen Impfzyclus abgenommen worden war, ließ jegliche Tollwutantikörper vermissen. Eine weitere Person hatte etwa 18 Monate vor der Blutentnahme 5 sowie 6 Monate vor der

Blutentnahme 2 Vakzinedosen erhalten. KB-Antikörper waren bis zu einer Verdünnung von 1:8 erkennbar. SN-Antikörper mit einem Titer von 8,4 sowie im Interferenztest vermehrt vorhanden.

Die einzelnen Ergebnisse sind in folgender Tabelle zusammengestellt:

	5 Impfungen			6 Impfungen		
Zeit in Wochen	SN-AK	KB-AK	IF-AK	SN-AK	KB-AK	IF-AK
5 Tage	0	< 4	0			
2				8,4	4	-
3	0	4	0			
4	8,4	4	++			
5	18,4	4	++	8,4	8	++
				40	4	+
6				40	4	-
10	18,4	4	++			
11	40	-	++	8,4	< 4	++
12	8,4	<4	++	18,4	8	++
	8,4	-	-	8,4	4	+
				40	8	++
13	18,4	4	+	40	4	++
	0	4	0			
15				40	< 4	++
				8,4	< 4	++
				40	4	++
				40	< 4	++
				18,4	< 4	++
16				40	4	++
				40	4	++
				18,4	8	++
17	0	0	+	18,4	4	++
	0	0	0	18,4	4	++
32				40	< 4	-

Zeit	Zahl der Impf.	KB-AK	SN-AK	IF-AK
18 + 6 Monate	5 + 2	8	8,4	++
etwa 4 Wochen	etwa 12 Semple-Vakzine-Inj.	<4	18,4	0
etwa 6 Wochen	6 Semple-Vakz.-Injektionen	4	40,0	++
17 Wochen	1	<4	0	0
6 Jahre	6	<4	0	0
14 Wochen	?	<4	8,4	+
13 Wochen	?	16	40,0	-
11 Wochen	?	4	8,4	++

KB-AK : Reziproke Angabe der Serumverdünnung, in der noch komplementbindende Antikörper nachweisbar sind.

SN-AK : Anzahl der LD_{50}-Einheiten, die von 0,02 ml Serum neutralisiert werden.

IF-AK : Im Interferenztest nachgewiesene Antikörper

+ : Antikörper sind vorhanden
++ : Antikörper sind vermehrt vorhanden.

0 : Keine Antikörper nachweisbar.

- : Nicht durchgeführt.

Abb. 1: Neutralisationstiter im Serum von 17 Personen die 5 aufeinanderfolgende Hempt-Vakzine-Injektionen und 1 Booster-Injektion etwa 4 Wochen später erhalten haben, in Abhängigkeit vom Zeitpunkt der Blutentnahme (in Wochen) nach Impfbeginn. Die mit Punkt gekennzeichneten Titer gehören zu den Seren einer Person.

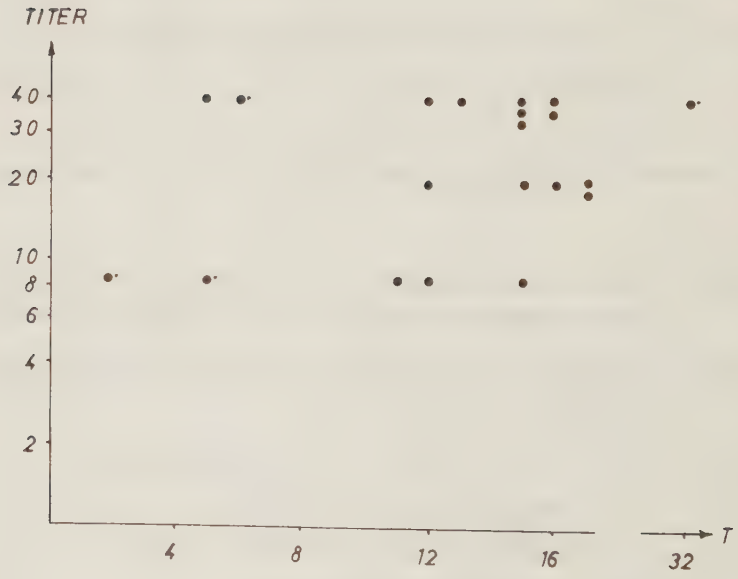


Abb. 2: Neutralisationstiter im Serum von 11 Personen, die 5 aufeinanderfolgende Hempt-Vakzine-Injektionen erhalten haben in Abhängigkeit vom Zeitpunkt der Blutentnahme (in Wochen) nach Impfbeginn. Die mit Punkt gekennzeichneten Titer gehören zu den Seren einer Person.

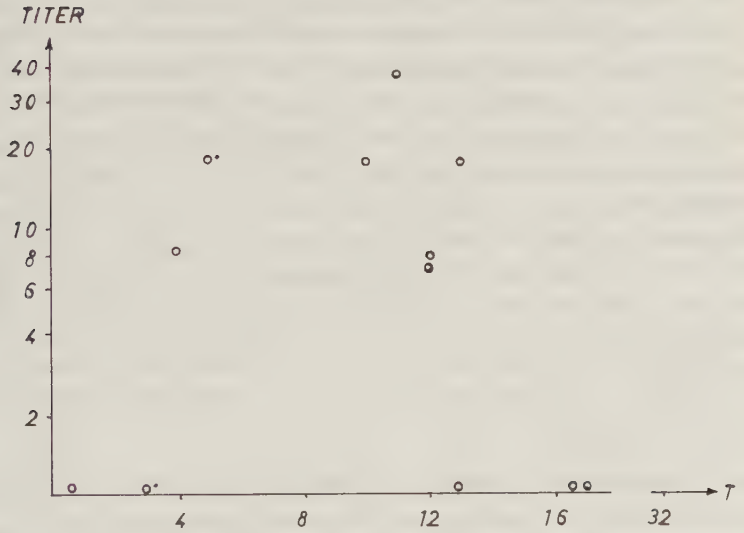
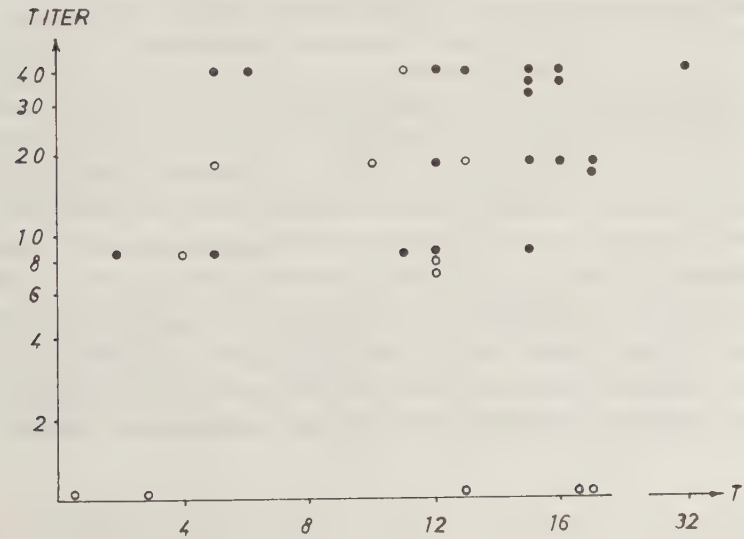


Abb. 3: Übereinanderprojektion von Abb. 1 und Abb. 2.



Diskussion

Die Beurteilung einer therapeutischen Maßnahme ergibt sich aus der Summe ihrer Wirkungen. In der Tollwutbehandlung sind dies die gewünschte Verhütung der Erkrankung, die leichten und schweren Neurokomplikationen, die lokalen und generalisierten Reaktionen, sowie die Störungen des Allgemeinbefindens. Bei einer tödlich verlaufenden Erkrankung wie der Tollwut ist es gerechtfertigt, leichte und rasch vorübergehende Nebenwirkungen in Abrechnung zu stellen. Es bleiben die mit Lähmungen einhergehenden, zu geistigen Defektzuständen oder zum Tode führenden Komplikationen. Sie treten, wie in der Einleitung ausgeführt, einmal bei 2 - 3000 Impfungen mit der Hemptvakzine auf.

Viel schwieriger ist es, ein Zahlenverhältnis zu ermitteln, das angibt, wieviele sicher tödliche Erkrankungen nach der Infektion durch die Impfung abgewendet werden können. Gerfeld (1966) nimmt an, daß mindestens 8 % der von tollwutkranken Tieren verletzten und nicht geimpften Personen erkranken würde, wogegen die Mortalität unter den Geimpften mit etwa 0,5 % angegeben wird. Das bedeutet, daß von 16 zum Tode führenden Erkrankungen 15 durch die Impfung verhütet werden würden. Sartorius und Mitarbeiter geben 1957 den Prozentsatz der Todesfälle mit einer Lebensfrist von mehr als 33 Tagen nach der Hempt-Vakzination mit 0,1 % an. Da von 4,8 bis 6 Gesamttodesfälle sich einer in den ersten 33 Tagen ereignet, ist bei 1200 bis 1500 Geimpften mit einem dieser hoffnungslosen Fälle zu rechnen.

Ergänzend und klärend steht den statistischen Erhebungen der Nachweis gegen das Tollwutvirus gerichteter Antikörper im Serum wutschutzgeimpfter Personen zur Seite. Er gibt Auskunft über den spezifischen Antigengehalt einer

Vakzine, der im Rahmen der aktiven Immunisierung die Antikörperbildung gegen das die Krankheit verursachende Agens bewirkt.

Zu diesem Zweck wurden die Seren von 28 Personen, die 5 aufeinanderfolgende Injektionen der Hempt-Vakzine sowie zum größeren Teil eine weitere Injektion etwa 4 Wochen später erhalten hatten, auf ihren Gehalt an Rabiesantikörpern untersucht.

Leider blieben die Versuche, den Antikörpernachweis in Anwendung des indirekt fluoreszierenden Antikörpertestes zu erbringen, ergebnislos, obwohl verglichen mit dem SN-Test die größere Empfindlichkeit dieser Methode von Peck und Thomas et al. beschrieben worden ist und in 33 eigenen Seren neutralisierende Antikörper gefunden wurden.

Neutralisierende Antikörper im Serum Hempt-vakzinierter Personen sind bereits von Kuwert nachgewiesen worden. Seiner Arbeit ist entsprechend eigener Untersuchungsergebnisse, die individuelle Reaktion der Geimpften bezüglich der Antikörperbildung zu entnehmen. So konnte er bei einem Patienten, der 29 Vakzinedosen (116 ml) erhalten hatte, keine neutralisierende Antikörper nachweisen (Kuwert, 1967). Diese unterschiedliche Reaktion auf die Tollwutschutzimpfung wird gleichermaßen dargetan von Versuchsergebnissen, die Atanasiu, Dean et al. erbracht haben (1967).

Vivell und Mitarbeiter untersuchten die Seren von 71 Kindern, die nach Kontakt mit einer tollwütigen Katze durch 6 Hempt-Vakzineinjektionen geimpft worden waren, auf das Vorhandensein neutralisierender Antikörper.

Nach 8 Wochen war in 70 Seren, bei einer Belastungsdosis von 200 LD_{50}, ein mittlerer Titer von 1:60 bzw. 1:70, mit großer individueller Streuung, nachweisbar. 24 Wochen später gelang der Antikörpernachweis nur noch in 21 von 51 Seren (Vivell et al., 1969).

Eichwald hat im Serum von 345 mit der Hempt-Vakzine ge-

impften Personen komplementbindende Antikörper nachzuweisen versucht. Die Prozentangaben komplementbindender Seren bestätigen von neuem die unterschiedliche Antikörperentwicklung in den einzelnen Personen nach der Impfung, wobei 90 Tage nach Impfbeginn der Prozentsatz positiver Seren am höchsten war.

In den eigenen Untersuchungen ließen sich in einem Serum, von einem Patienten mit 5 Vakzineinjektionen stammend, 3 Wochen nach der Impfung zwar KB- aber keine SN-Antikörper erkennen. Bei den übrigen Seren, von anderen Patienten später abgenommen, war der umgekehrte Befund, nachweisbare SN-, nicht nachweisbare KB-Antikörper, ab der 11. Woche zunehmend zu erheben. Diese Beobachtung würde der Feststellung entsprechen, daß nach Viruserkrankungen neutralisierende Antikörper meist länger verweilen als komplementbindende Antikörper. Bei neurotropen Viruserkrankungen treten im allgemeinen die letztgenannten nach den neutralisierenden Antikörpern auf (Prier, 1966).

In beiden Seren der in Thailand nach Semple-Vakzination verstorbenen Personen waren neutralisierende Antikörper im Tierversuch und im Interferenztest, komplementbindende Antikörper nur in einem Serum bei der Verdünnung 1:4 nachzuweisen. Die Inkubationszeit betrug in einem Fall etwa 4 Wochen, im anderen Fall etwa 6 Wochen. Möglicherweise war bei beiden die Lebensfrist kürzer als 33 Tage, was besagen würde, daß eine Rettung selbst durch sofort nach der Infektion einsetzende aktive Schutzimpfung nicht möglich gewesen wäre.

Der Nachweis gegen Tollwut gerichteter Antikörper im Interferenztest ist in dieser Anwendung erstmals beschrieben. Da diese Nachweismethode gegenüber der Serumneutralisation, getestet in weißen Mäusen und der KBR, einen erheblich größeren Material- und Arbeitsaufwand erfordert, sowie frühestens nach 4 Tagen zu einem Ergebnis führt, ist ihre praktische Bedeutung gering einzuschätzen.

Mit Sicherheit kann jedoch angegeben werden, daß die Hempt-Vakzine Tollwut-Antigen in ausreichender Quantität enthält, um die Antikörperbildung anzuregen. Dieses Antigen wird in 5 bzw. 6 Injektionen jedoch zusammen mit 1785 bzw. 2142 mg zentralnervöse Substanz verabfolgt (Bohlmann, 1968).

Da in der Pathogenese postvakzinaler Lähmungen neuroallergische Mechanismen Bedeutung haben, ist durch eine Verminderung des Anteiles unspezifischer Ballaststoffe von Nervengewebe eine Verminderung der zu Lasten der Impfung fallenden Neurokomplikationen zu etwarten. Die Forschung hat auf diesem Weg bereits Erfolge erzielt. Gereinigtes, immunologisch hochaktives Virusmaterial steht in tierexperimenteller Erprobung (Kuwert, 1969).

Zusammenfassung

40 Seren von 28 mit der Hempt-Vakzine der Behring-Werke gegen Tollwut durch 5 bzw. 6 Injektionen geimpfte Personen wurden auf ihren Antikörpergehalt, gerichtet gegen das Tollwutantigen, untersucht. Die Seren waren in einem Zeitraum von 5 Tagen bis 32 Wochen nach Beginn der Impfung abgenommen worden. Nach erfolglosen Versuchen, die Antikörper auf antigenhaltigen Präparaten durch indirekte Immunfluoreszenz zu bestimmen, konnte der Nachweis neutralisierender Antikörper im Serumneutralisationstest durch intracerebrale Beimpfung 3-4 wochenalter NMRI-Mäuse, sowie komplementbindender Antikörper in der Komplementbindungsreaktion, erbracht werden.

Nachweisbare Antikörper, in einem Serum bereits 12 Tage nach Beginn der Impfung erkennbar, waren bis auf 3 Personen von allen Geimpften, die 5 oder 6 Vakzineinjektionen erhalten hatten, gebildet worden.

Die höchsten Antikörpertiter neutralisierten 40 LD_{50}/ 0,02 ml Serum. Komplementbindende Antikörper waren in einzelnen Seren bis zu einer Verdünnung von 1:8 erkennbar.

In weiteren Versuchen wurde die Rabiesvirusneutralisation durch das Serum der Geimpften im Interferenzsystem untersucht. Die Aktivität gegen Tollwut gerichteter Antikörper konnte durch das Ausbleiben der Interferenz tollwutinfizierter Kulturen gezeigt werden, wobei als Challenge-Virus das für den Menschen apathogene Semliki-Forest-Virus verwendet wurde. Mit wenigen Ausnahmen entsprachen die Ergebnisse denen, die im Neutralisationstest erhoben worden waren.

Literaturnachweis

Atanasiu, P., Bahmanyer, M., Baltazar, M., Fox, J.P., Habel, K., Kaplan, M.M., Kissling, R.E., Komorov, A., Koprowski, H., Lépine, P., Perez-Gallardo, F.,and Schaeffer, M.: Rabies neutralizing Antibody Response to different Schedules of Serum an Vaccine Inoculations in non-exposed Persons. Bull. WHO 14, 593 (1965).

Atanasiu, P., Dean, D.J., Habel, K., Kaplan, M.M., Koprowski, H., Lépine, P., Serié, C.: Rabies neutralizing Antibody Response to different Schedules of Serum and Vaccine Inoculations in non-exposed Persons. Bull. WHO 36, 561 - 365 (1967).

Bohlmann, H.G.: Schwere bleibende Schädigung nach Tollwutschutzimpfung mit der Hempt-Vakzine. Med. Klin. 48, 1932 - 1934 (1968).

Crowther, D., and Melnick, J.L.: The Incorporation of Neutral Red and Acridine Orange into developing Poliovirus particles making them photosensitive. Virology 14, 11-21 (1961).

Eichwald, C.: Experimentelle serologische Beobachtungen beim Menschen und beim Tier nach Rabiesschutzimpfung. J Hyg Epidem, 1963 - VII, 281-189.

Fermi, C.: Méthodes de vaccination et sérum-vaccination appliquées à l'homme dans l'Institut antirabique de Sassari. Zbl Bakt I Orig 53, 533-537 (1910).

Gerfeld, E.: Anthropozoonosen in Vergangenheit und Gegenwart. III. Viruskrankheiten. 11. Tollwut- Lyssa - Rabies - Hydrophabia. Med. Welt 37, 1947-1949 (1966).

Gildemeister, H.: Die Tollwutschutzimpfung. In: Handbuch der Schutzimpfungen. (Hrsg. A. Herrlich) Seite 617-634, Berlin-Heidelberg-New York: Springer 1965.

Gipsen, R., and Saathof, B.: Neutralizing and fluorescent Antibody Response in Man after antirabies Treatment with Suckling Rabbit Brain Vaccine.
Arch Ges Virusforsch 15, 377-386 (1965).

Goldwasser, R.A., and Kissling, R.E.: Fluorescent Antibody Staining of Street and Fixed Rabies Virus Antigens.
Proc Soc Exp Biol Med 98, 219-223 (1958).

Habel, K.: Habel test for potency.
Laboratory Techniques in Rabies, second Edition, 140-141, WHO Geneva, 1966.

Hempt, A.: Sur une méthode rapide de traitement antirabique.
Ann Inst Pasteur (Paris) 33, 632-633 (1925).

Johnson, H.N.: Rabies Virus. In: Viral and Rickettsial Infektions of Man. Edited by F.L.Horsfall, J. Tamm, Fourth Edition, Seite 814-840.
J.B. Lippincott Company, Philadelphia, Montreal, 1965.

Kaplan, M., Wecker, E., Forske, L., Koprowski, H.: An Indicator Plaque-forming System for Demonstration of Interference by noncytocidal Strains of Rabies Virus.
Nature 186, 821-822 (1960).

Kaplan, M., Wiktor, T.J., Maes, R.F., Campbell, J.B., Koprowski, H.: Effect of Polyions on the Infectivitiy of Rabies Virus in Tissue Culture: Construction of an Single-Cycle Growth Curve.
Virology, Feb. 1967, 145-151.

Kissling, R.E., and Reese, D.R.: Antirabies Vaccine of Tissue Culture Origin.
J Imm 91, 362-368 (1963).

Kligler, L.J., Bernkopf, H.: Cultivating of Rabies Virus in the Allantoic of the Developing Chick Embryo.
Proc Soc Exp Biol Med 39, 212-214 (1938).

Koch, I., Konnerth, S.: Verändern sich die Eigenschaften eines Tollwutvirus fixe durch extracerebrale Passagen?
Berlin München Tierärztl Wschr 79, 135-136 (1966).

Kollmannsberger, A.: Neurologische Komplikationen nach Tollwutschutzimpfung.
München Med Wschr 5, 259-262 (1966).

Koprowski, H., and Cox, H.R.: Studies on Chick Embryo Adapted Rabies Virus.
J Imm 60, 533-554 (1948).

Kuwert, E.: Versuche zur Antigenität, Schutzkraft und Enzephalogenität der Hempt-Vakzine.
Arch Hyg Bakt 151, 130-145 (1967).

Kuwert, E.: Das Tollwutvirus.
Med Wschr 34, 1697-1703 (1969).

Lenette, E.H.: Methodes of Inoculation of Embrynated Hen's Eggs. In: Diagnostic Procedures of Viral and Rickettsial Deseases. (E.H.Lenette, N.J.Schmidt). Third Edition, Seite 58-64. American Public Health Association, Inc. New York, 1964.

Lockart, R.Z.: Biological Properties of Interferons; Criteria for Acceptance of a Viral Inhibitor as an Interferon. In: Interferons (N.B.Finter). North-Holland Publishing Company, Amsterdam (1966).

Ott, H.: Wutschutzbehandlung. Schutzmaßnahmen bei Rabiesinfektion.
Med Wschr 46, 2125-2127 (1967).

Ott, H.: Rabies 1968.
Med Welt 19, 2743-2753 (1968).

Ouchterlony, Ö.: Antigen-Antibody Reactions in Gels.
Acta Path Microbiol Scand 32, 231-240 (1953).

Parker, R.C., Hoeber, P.B.: Methods of Tissue Culture, Third Edition.
Medical Division of Harper and Brothers, 1961.

Pasteur, L., Chamberland, C., Roux, E. et Thullier, M.: Sur la rage.
S.R.Acad.Sci.(Paris) 92, 1259-1261 (1887).

Peck, F.B. Jr.: The Detection of Human Rabies Antibody by the Indirect Fluorescence Test. Internal Symposium on Rabies, Talloires, 1965.
Symp Series immunobiol Standard Vol I, 201-206. Karger, Basel-New York, 1966.

Ping-Yao Cheng: Purification, Size, and Morphology of a Mosquito-borne Animal Virus, Semliki Forest Virus.
Virology 14, 124-131 (1961).

Pittmann, B., Hebert, G.A., Cherry, W.B. and Taylor, G.C.: The Quantitation of Nonspecifie Staining as a Guide for Improvement of Fluorescent Antibody Conjugates.
J Imm 98, 1196-1203 (1967).

Prier, J.E. In: basic medical virology, Seite 91 ff.
The Williams and Wilkins Company
Baltimore 1966.

Reed, L.J., and Muench, H.: A simple Methode of Estimating Fifty Percent End Points.
Amer J Hyg 27, 493-497 (1938).

Ruegsegger, J.M., and Sharpless, G.R.: Flury Rabies Vaccine for Human Use.
Arch Intern Med 110, 754-757 (1962).

Sartorius, F., Eichwald, C., Winkler, Ch.: Dreijahresberichte des Staatlichen Instituts für Tollwutschutzimpfung, Potsdam (1959-1961 und 1962-1964).
Beilage zum Deutschen Gesundheits-Wesen.
Berlin: VEB Verlag Volk und Gesundheit, 1962 und 1965.

Sartorius, F., Starke, G., Winkler, Ch.: Betrachtungen und Lehren zu einer Anzahl von menschlichen Tollwuttodesfällen der letzten Jahre.
Z Aerztl Fortbild 51, 638-643 (1957).

Schindler, R.: Immunisierungsversuche gegen Tollwut mit verschiedenen Impfstoffen.
Z Hyg 142, 363-370 (1956).

Schindler, R.: Untersuchung über das Komplementbindungsantigen des Tollwutvirus.
Zbl Bakt (Orig) 186, 139-151 (1962).

Schindler, R.: Untersuchungen über die Grundlagen der aktiven Immunität gegen Tollwut.
Zbl Bakt (Orig) 188, 311-322 (1963).

Schneider, L.G.: Erfahrungen mit fluoreszenzmarkierten Antikörpern bei der routinemäßigen Laboratoriumsdiagnose der Tollwut. I. Mitteilung: Die fluoreszierende Antikörpertechnik.
Zbl Veterinärmed (B) Bd. 11 Heft 3, 207-230 (1964).

Selimov, M.A., Boltucij, L.G. und Semenovova, J.V.: Dynamik der virusneutralisierenden Antikörper im Blut von schwer gebissenen und mit Gammaglobulin und der Antirabies-Vakzine geimpften Menschen.
J Hyg Epidem, 487-500, 1959, III.

Selimov, M.A., Chuprikova, M., Kalinina, L., Sharova, Z.: Interference in Tissue Cultures induced by Rabies Virus.
Acta virol 9, 445-448 (1965).

Semple, D.: On the Nature of Rabies and Antirabic Treatment. Brit Med J 1919/II, 333-337.

Sikes, R.K., and Larghin, O.P.: Purified Rabies Vaccine: Development and Comparsion of Potency and Safety with two human Rabies Vaccines. J Imm 99, 545-553 (1967).

Sommerville, R.G.: The Production of Fluorescent Antibody Reagents of Virus Diagnosis in the Albino Mouse. I. Hyperimmune Anti-species Serum. Arch Ges Virusforsch 20, 445-451 (1967).

Starke, G., Winkler, Chr.: Über einige Todesfälle an Tollwut und ihre Lehren für die Durchführung der Tollwutschutzimpfung. Deutsch Gesundh 38, 9.Jahrgang, Berlin (1954).

Steck, K.: Zur Wirksamkeitsprüfung von Tollwutimpfstoffen. 4. Mitteilung: Der Mäuseschutzversuch mit zweimaliger Immunisierung. Z Immun Allergieforsch 125, 30-36 (1963).

Steck, K., Schneider, W.: Zur Wirksamkeitsprüfung von Tollwutimpfstoffen. 3. Mitteilung: Der Mäuseschutzversuch mit einmaliger Immunisierung. Z Immun Allergieforsch 125, 17-29 (1963).

Thomas, J.B., Sikes, R.K.,and Ricker, A.S.: Evaluation of indirekt Fluorescent Antibody Technique for Detection of Rabies Antibody in Human Sera. J Imm 91, 721-723 (1963).

Vivell, O., Schnitzke, H., Jaeger, O., Barth, R., Hennessen,W.: Erfahrungen mit der Tollwutschutzimpfung nach Hempt. Arch Kinderheilk, 179. Band, 2. Heft, 145-154, (1969).

Wilke: Resultate der Pasteur'schen Schutzimpfung in Russischen Instituten. Hyg Rundschau, IV Jahrgang, 920-926 (1894).

Wiktor, T.J.: Dynamics of Rabies Virus Infections in Tissue Culture. Internal Symposium on Rabies, Talloires, 1965. Symp Series immunobiol Standard, Vol I, 65-80. Karger, Basel-New York, 1966.

Wöhle, W.: Zur Wirksamkeit der Tollwut-Vaccine nach Hempt beim Hund. Aus der Behringwerke AG, Seite 2-9, 3. 9. 1965.

World rabies situation. WHO chron 20, 27-29 (Jan.1966).

Lebenslauf

Am 9.Mai 1942 wurde ich, Andreas Sziegoleit, in Insterburg/Ostpr.geboren. Nach der Übersiedlung nach Stuttgart besuchte ich 4 Jahre in Stuttgart-Weilimdorf die Grundschule, anschließend von 1952 bis März 1961 das Gymnasium in Stuttgart-Feuerbach.

Von Nov. 1961 bis Febr. 1967 studierte ich Medizin an der Universität Tübingen. Nach dem 2. Semester legte ich das Vorphysikum, im 4. Semester das Kleine Latinum, nach dem 5. Semester das Physikum und nach dem 11. Semester das Staatsexamen ab.

Vom 1. Sept. 1967 bis 31. Aug. 1969 leistete ich Medizinalassistentenzeit ab. Davon verbrachte ich 10 Monate am Hygiene-Institut der Universität Tübingen, 4 Monate in der Chirurgischen Abteilung des Kreiskrankenhauses Plochingen, 6 Monate an der Medizinischen Klinik I des Bürgerhospitals Stuttgart, 4 Monate an der Landesfrauenklinik in Stuttgart.

Am 10. Sept. 1969 erhielt ich die Bestallung als Arzt. Seit 1. Okt. 1969 arbeite ich als Assistent im Pathologischen Institut der Städtischen Krankenanstalten in Esslingen.

Druckbüro Frau Elly HUTH, 74 Tübingen